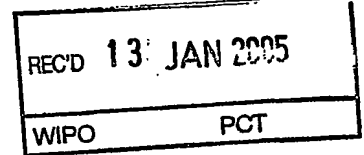


12.11.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年11月4日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-374837  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2003-374837]

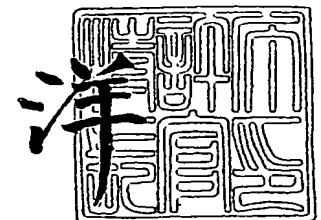
出願人 明治乳業株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3117075

【書類名】 特許願  
【整理番号】 M1-A0303  
【提出日】 平成15年11月 4日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所  
                                内  
    【氏名】 坪井 洋  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所  
                                内  
    【氏名】 池上 秀二  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内  
    【氏名】 紀 再思  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000006138  
    【氏名又は名称】 明治乳業株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

ハス科植物の調製物からなる  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を含む糖尿病治療用または予防用医薬組成物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を含む糖尿病治療用または予防用食品組成物。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、植物調製物からなる $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤の利用に関する。

## 【背景技術】

【0002】

生活習慣病と呼ばれる糖尿病患者は増加傾向にある。わが国の「糖尿病が強く疑われる人」は推計690万人、「糖尿病の可能性を否定できない人」を含めると約1370万人にものほり（厚生労働省平成9年糖尿病実態調査）、糖尿病改善の選択肢が広く求められている。糖尿病は、インスリン供給低下または作用不足による慢性高血糖を特徴とし、種々の代謝異常を伴う疾病群である。代謝異常の程度によって、無症状からケトアシドーシスや昏睡に至る幅広い病態を示す。代謝異常が長期間持続すると、網膜、腎、神経に特有の合併症を来たしやすく、また、動脈硬化も促進される。糖尿病の治療は、食事療法、運動療法、薬物療法によって血糖値をコントロールすることにより行われる。

【0003】

糖尿病の経口剤には、スルホニルウレア（SU）剤、ビグアナイド（BG）剤、インスリン抵抗剤、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤などがある。このうち $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤は、小腸粘膜微絨毛に存在するマルターゼ等の糖質水解酵素を競合的に阻害し、腸管内における糖質の吸収を遅延させる薬剤である。既にアカルボースやボグリボースといった $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤が、臨床で使用されている。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤には、食後の著しい血糖上昇を抑制するとともに、血糖日内変動幅を小さくする効果があり、さらには、インスリン依存型糖尿病患者にも適応可能であると考えられている（日医大誌 1999 第66巻 第3号）。アカルボースは、放線菌 *Actinoplanes strain SE 50*の培養液から見出され、ボグリボースは、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus sub sp. limoneus*の培養液から発見された。

【0004】

一方これまでに、植物中に存在する $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有する物質の報告がある（特開2003-81858、特開2000-229875）。

【特許文献1】特開2003-81858

【特許文献2】特開2000-229875

【特許文献3】特開平8-198769

【非特許文献1】日医大誌 1999 第66巻 第3号

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は植物由来の新規な $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用物質および $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用物質を用いた糖尿病の治療または予防薬を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、植物から $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有する物質を見出すべく、鋭意研究を行った。

【0007】

そこで、本発明者らはハス科の多年草であるハスに注目した。ハスは、その根が食用として利用される以外にも、種子や葉などは漢方薬の処方や健康食品などに広く用いられている。ハスの葉には肥満改善効果があることは公知であるが（特開平8-198769）、血糖値上昇抑制効果については知られていない。

【0008】

本発明者らは、ハス抽出物を作製し、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびその基質であるスクロ

ースと反応させ、生成されるグルコース量を測定した。ハス抽出物添加による酵素反応への影響を、グルコース測定値を用いて算出したところ、ハス抽出物に $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性があることが明らかになった。さらに、本発明者らがハス抽出物およびショ糖をマウスに投与し血糖値を測定したところ、ハス抽出物により血糖値が抑制されていることが明らかになった。すなわち、本発明者らはハスの抽出物が $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有することを明らかにするとともに、該ハスの抽出物が血糖値のコントロールに使用できることを見出した。

#### 【0009】

本発明は、具体的には、

- (1) ハス科植物の調製物からなる $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤
- (2) 上記(1)に記載の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を含む糖尿病治療用または予防用医薬組成物
- (3) 上記(1)に記載の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を含む糖尿病治療用または予防用食品組成物を提供するものである。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

ハス科植物調製物からなる $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤により、血糖上昇を抑制することが可能となった。患者増加傾向にある糖尿病について、治療または予防薬の選択肢の一つを新たに提供することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

本発明は、ハス科植物の調製物からなる $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を提供する。実施例のとおり、ハス調製物に $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性があることが明らかになった。本発明は、二糖類を単糖類に分解する $\alpha$ -グルコシダーゼ(マルターゼ、スクラーゼ等)の作用阻害を期待する用途であれば、いかなる用途にも使用し得る。特に、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤の動物への投与は、小腸内マルターゼ等による二糖類から単糖類への分解を阻害し、腸管内における糖質の吸収を遅延させ、結果として血糖値上昇抑制効果をもたらすことが期待できる。本発明 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤による血糖値上昇抑制効果は、実施例のとおり動物実験において実証されている。

#### 【0012】

ハス科植物には、ハス(*Nelumbo nucifera*)、キバナバスなどがある。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害作用は、ハスのみならず、他のハス科植物や、近縁のスイレン属、オニバス属、コウホネ属、ジュンサイ属の調製物にも存在すると考えられる。したがって、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害作用物質は、これら植物から得ることもできる。本発明において、植物の調製物とは、植物の全体または部分について何らかの加工を施したものをいう。例えば、植物抽出物、植物の搾汁、植物エキス、乾燥させた植物、植物を細断したものは、本発明における植物の調製物に含まれる。植物の調製物の製造方法は、特に限定されず、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害作用を引き出せる方法であればよい。溶媒による抽出や、植物を粉末状にする方法でもよい。一例を示せば、実施例の方法により製造することができる。

#### 【0013】

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤であることの確認は、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびその基質である二糖類に被験物質を添加して酵素反応試験を行い、被験物質非添加の場合と比較して、酵素反応の阻害率を求めることで評価することができる。

#### 【0014】

本発明は、上記 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を含む糖尿病治療用または予防用医薬品を提供する。上記 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤の血糖値上昇抑制効果は上述のとおり実証されており、上記 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を糖尿病治療用または予防用医薬品として使用しうることは明白である。本発明における糖尿病の治療または予防には、糖尿病

患者の治療、糖尿病発症の可能性がある者いわゆる境界群の発症予防のほか、糖尿病患者であるかを問わず、食後血糖上昇を抑制する目的で使用することが含まれる。

#### 【0015】

本発明の糖尿病治療または予防用医薬組成物は、一般的な医薬製剤として調製される。例えば、上記  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を製剤上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤等の製剤として経口投与または非経口投与に適した形態で処方される。賦形剤としては、例えば、乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、ソルビット、血漿セルロース等が挙げられる。結合剤としては、例えば、ポリビニルピリアゴム、トラガント、ゼラチン、シュラック、ヒドロキシプロピル、セルロース、シドロキシプロピルスターチ、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

#### 【0016】

薬剤が糖尿病に有効であるか否かは、例えば実施例のように、被験動物に給餌と同時に薬剤を投与し、給餌後経時的に血糖値を測定し、その血糖値の上昇抑制効果をみることで確認することができる。または、糖尿病を発症した動物に薬剤を投与し、該被験動物の血糖値を測定することにより確認することもできる。薬剤投与前後の随時血糖値を被験物質投与群と対照群の間で比較し、薬剤投与群の血糖値が対照群と比較して低下すれば、該薬剤は糖尿病に有効である。

#### 【0017】

また本発明は、上記のハス科植物の調製物からなる  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を含む糖尿病治療用または予防用食品組成物を提供する。ハス科植物は従来から食品として摂取されており、安全性が高く、食品組成物に加工することが可能である。ハス科植物調製物には糖の吸収を穏やかにし血糖値の上昇を抑さえる効果がある。糖尿病患者の治療に有用なことは勿論、糖尿病患者のみならず、いわゆる境界域や血糖が気になる糖尿病予備軍ともいえる人たちが本発明による食品を摂取することにより、医薬品以外の方法で血糖値を効果的にコントロールし、糖尿病の予防が可能となる点で、特に有用である。

#### 【0018】

本発明の食品組成物として、例えば、糖尿病用食品、特別用途食品、特定保健用食品、血糖値降下作用を標榜可能な機能性食品、栄養機能食品、健康食品、栄養補助食品、経腸栄養食品、等を挙げることができるが、糖尿病の予防若しくは治療目的または血糖値上昇抑制目的で使用されるものであればこれらの食品に限定されない。

#### 【0019】

該組成物の製造方法は、当業者にとって周知慣用技術である。すなわち、本発明の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤と食品衛生上許容される配合物を混合して、糖尿病用食品、特別用途食品、特定保健用食品、血糖値降下作用を標榜可能な機能性食品、栄養機能食品、健康食品、栄養補助食品、経腸栄養食品等に加工することができる。既存の食品に本発明の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害剤を添加してもよい。例えば安定化剤、保存剤、着色料、香料、ビタミン等の配合物顆粒状、粉末状、カプセル状、液状、クリーム状、飲料等の組成物に適した形態とすることができる。

#### 【実施例】

#### 【0020】

以下、実施例によりさらに本発明を詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

#### 〔実施例1〕ハス科植物の抽出物の調製

乾燥したハスの葉 1 kg に対し、水 10 L を加える。pH を 6.0 に調整し、30 分間室温にて静置する。その後、減圧下 90℃ で 1 時間沸騰抽出する。ろ液 (1) と残渣に分別し、残渣には 10 倍量の水を加え、減圧下 90℃ で 1 時間沸騰抽出する。ろ液 (2) と残渣に分別し、ろ液 (1) とろ液 (2) をあわせる。減圧下、加熱濃縮により、比重 1.1 まで濃縮後、スプレードライヤーで乾燥粉体約 100 g を得た。

## 【0021】

【実施例2】  $\alpha$ -グルコシダーゼ酵素液の調製

凍結したラットの小腸組織片を液体窒素でさらに固化し、細かく粉碎する。これに対し、重量比で5倍量の50mMマンニトール/2mMトリス塩酸緩衝液を加え、氷冷下で2分間ホモジナイズ後、1M塩化カルシウム溶液を加えて、最終濃度を10mMとし、さらに4℃で20分間攪拌した。これを3000rpm、30分間遠心分離して上清をとり、この上清をさらに4℃、15000rpm、30分間遠心して沈殿物を回収する。この沈殿物を10mMマレイン酸水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.8)で2回洗浄し、最終的に、10mMマレイン酸水酸化ナトリウム緩衝液10mLで懸濁したものを $\alpha$ -グルコシダーゼ酵素溶液とした。

## 【0022】

【実施例3】  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害反応試験

$\alpha$ -グルコシダーゼ酵素溶液10 $\mu$ L、被験サンプル(種々の濃度のハスの葉抽出液)10 $\mu$ L、基質溶液(20mg/mLスクロース、20mMリン酸緩衝液)20 $\mu$ L、20mMリン酸緩衝液生理食塩水10 $\mu$ Lを混合し、37℃で40分間インキュベートした。反応終了後、生成されたグルコース量をグルコースCII-テストワコー(和光純薬工業(株))を用いて測定した。試料溶液の色がグルコース測定の際の吸光度に影響を与える可能性があるので、ブランク(酵素反応後被験物を添加したもの)をとり、その値でグルコース値を補正し、次式により阻害率を算出した。

阻害率(%) = (酵素反応後被験物添加グルコース濃度 - 被験物添加グルコース濃度) / 酵素反応後被験物添加グルコース濃度  $\times$  100

## 【0023】

結果を表1に示す。ハスの葉抽出乾固物の最終濃度4mg/mLでスクロースを基質とする $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を約50%阻害した。この結果より、糖の消化吸収に必須である $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を本発明の有効成分が阻害することにより、糖摂取後の血糖上昇を抑制することが証明された。

## 【0024】

【表1】

被 験 物	A (mg/dL)	B (mg/dL)	A-B (mg/dL)	阻害率 (%)
水	72.080	0.280	71.800	0.00
ハスの葉抽出物 2mg/mL	54.480	9.480	45.000	37.33
ハスの葉抽出物 4mg/mL	50.280	13.880	36.400	49.30
ハスの葉抽出物 8mg/mL	43.880	15.680	28.200	60.72
ハスの葉抽出物 12mg/mL	39.280	18.280	21.000	70.75
ハスの葉抽出物 16mg/mL	36.480	20.680	15.800	77.99
ハスの葉抽出物 20mg/mL	32.680	21.280	11.400	84.12

A: 酵素反応後被験物添加グルコース濃度 (mg/dL)

B: 被験物添加グルコース濃度 (mg/dL)

## 【0025】

## 【実施例4】 ショ糖負荷マウスにおけるハスの葉抽出物の血糖抑制作用の検討

ICRマウス雄性5週齢を入荷し、1週間の予備飼育を行った。予備飼育後、マウスを体重により1群6匹ずつ4群に分けた。そのうちの2群について、ハスの葉抽出物をショ糖と同時に経口投与した。投与したハスの葉抽出物の濃度は1g/kgまたは2g/kg、ショ糖の濃度は2g/kgとした。また、対照群としてアカルボース3mg/kgを同様にショ糖と同時に経口投与した。残りの1群には、ショ糖のみを投与した。各群マウスについて、血糖値を測定した。血糖値測定は、被験物質経口投与直前および投与後30、60、90、120、180、240分に行った。測定結果を図1に示す。ショ糖のみを投与した群と比較して、ハスの葉抽出物

投与群の血糖値上昇が抑制されていることが明らかになった。特に、ショ糖投与後30分の血糖上昇抑制効果大きい。

【図面の簡単な説明】

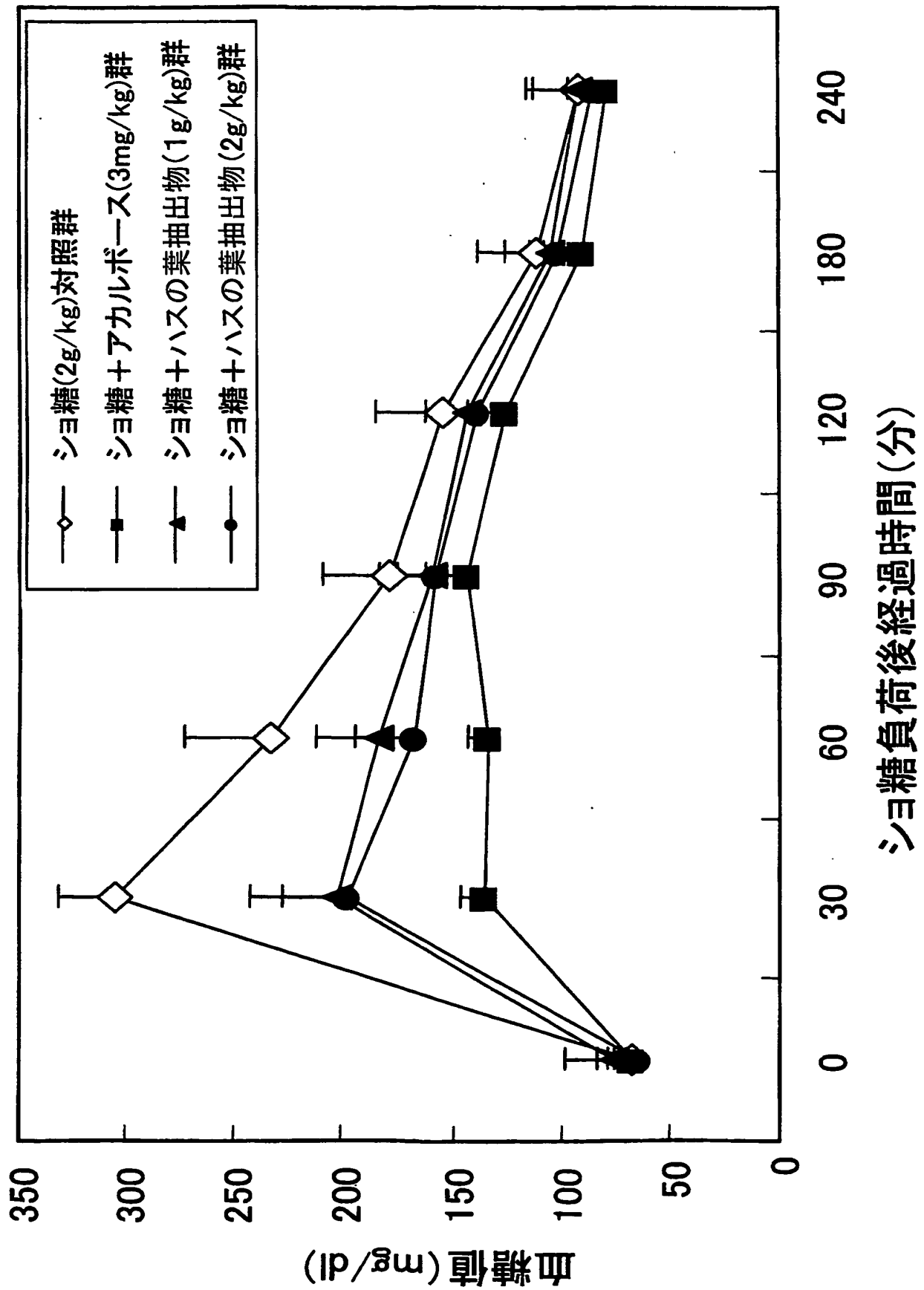
【 0 0 2 6 】

【図 1】 ショ糖負荷マウスにおけるハスの葉抽出物の血糖抑制作用を示す図である。



【書類名】 図面

【図 1】



**【書類名】 要約書**

**【課題】** 植物由来の新規な  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用物質および  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用物質を用いた糖尿病の治療または予防薬を提供する。

**【解決手段】** 植物の中からハスに注目し、ハス抽出物を作製した。 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびその基質であるスクロースと反応させ、ハス抽出物添加による酵素反応への影響を算出したところ、ハス抽出物に  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性があることが明らかになった。さらに、ハス抽出物およびショ糖をマウスに投与し血糖値を測定したところ、ハス抽出物により血糖値が抑制されていることが明らかになった。すなわち、ハスの抽出物が  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有することを明らかにするとともに、該ハスの抽出物が血糖値のコントロールに使用できることを見出した。

**【選択図】** なし

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 M1-A0303  
【提出日】 平成16年10月29日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-374837  
【補正をする者】  
【識別番号】 000006138  
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 発明者  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内  
【氏名】 坪井 洋  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内  
【氏名】 池上 秀二  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内  
【氏名】 紀 再思  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内  
【氏名】 伊藤 裕之  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内  
【氏名】 小田 宗宏  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内  
【氏名】 進 和男  
【その他】 本補正書で補正する理由は、発明者を、「坪井洋」「池上秀二」「紀再思」「伊藤裕之」「小田宗宏」「進和男」の6名を記載すべきところを出願時に誤って「坪井洋」「池上秀二」「紀再思」のみにしてしまった為であります。

特願 2 0 0 3 - 3 7 4 8 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 6 1 3 8 ]

1. 変更新月日	2 0 0 1 年 1 0 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 1 0 号
氏 名	明治乳業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**